

# Η Μέθοδος της Παρεμβολής του RNA (RNA Interference) στη Βιολογία και την Ιατρική

Δ. Μανδηλής<sup>1</sup>, Σ. Βλαχόπουλος<sup>1</sup>, Δ. Μήκας<sup>1</sup> και Β. Ζουμπουρλής<sup>1</sup>

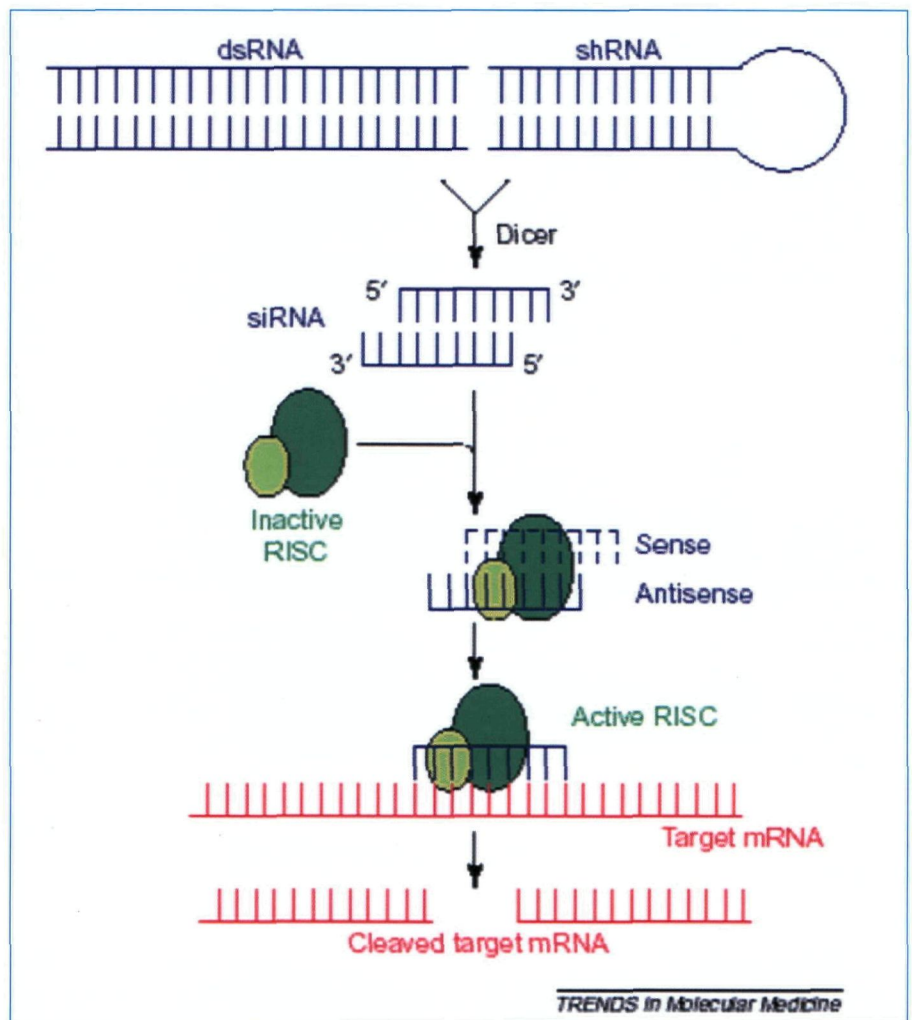
1. Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών, Εργαστήριο Μονάδας Βιοϊατρικών Εφαρμογών  
Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών, Αθήνα

## Εισαγωγή

**Η** παρεμβολή του RNA ή RNAi όπως αποκαλείται, είναι το φαινόμενο που προκαλεί τη μεταμεταγραφική σίγηση ενός γονιδίου μετά από ενδογενή παραγωγή ή από εισαγωγή στο κύτταρο ενός μικρομοριακού παρεμβτικού RNA (small interfering RNA – siRNA) με αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή του γονιδίου. Το φαινόμενο της σίγησης ενός γονιδίου μέσω του RNAi ανακαλύφθηκε αρχικά στον νηματοειδή σκώληκα *Caenorhabditis elegans* από τους Fire και Mello το 1998<sup>1</sup>. Αποτελεί έναν φυσικό, αρχέγονο αμυντικό μηχανισμό με τον οποίο τα φυτά και τα κατώτερα σπονδυλωτά καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων όταν απαντώνται στο κύτταρο δίκλινα μόρια RNA της ίδιας αλληλουχίας. Πιθανόν είναι αποτέλεσμα εξελικτικών μηχανισμών για την καταπολέμηση ιών, λοιμώξεων και μεμονωμένων γενετικών στοιχείων τα οποία εξαπλώνονται χρησιμοποιώντας ως γενετικό υλικό δίκλινο RNA (dsRNA). Ο μηχανισμός αυτός απαντάται σε όλα τα μέλη του φυτικού και ζωικού βασιλείου. Στα κύτταρα των θηλαστικών ωστόσο, έχει αντικατασταθεί από άλλους πιο εξελιγμένους αμυντικούς μηχανισμούς. Η απόδειξη ότι το RNAi μπορεί να εφαρμοστεί και σε κύτταρα θηλαστικών έδωσε στους ερευνητές ένα πολύ σημαντικό εργαλείο με το οποίο μπορούν να διακόψουν την έκφραση ενός γονιδίου και έτσι να κατανοήσουν τον ρόλο του γονιδίου αυτού, καθώς και της πρωτεΐνης που αυτό εκκράζει<sup>2</sup>.

Η γονιδιακή σίγηση μέσω της οδού του RNAi ενεργοποιείται από την ύπαρξη ενός δίκλινου μορίου RNA. Το ένζυμο Dicer το οποίο ανήκει στην οικογένεια των RNAσών III κόβει το δίκλινο RNA σε τμήματα μήκους 22 περίπου νουκλεοτιδίων, τα αποκαλούμενα μικρά παρεμβτικά RNAs (siRNAs). Τα siRNAs ζευγαλώνονται και η μία από τις δύο έλικες ενσωματώνεται σε ένα σύμπλεγμα μορίων που συνιστούν τη νουκλεάση RISC (RNA-induced silencing complex – RNA-σύμπλοκο που επάγει τη γονιδιακή σίγηση). Η έλικα του δίκλινου RNA που ενσωματώνεται στο RISC υβριδίζεται με το συμπληρωματικό RNA-στόχο ενεργοποιώντας τη νουκλεάση μέσα στο σύμπλοκο RISC η οποία κατακερματίζει τον στόχο (Εικόνα 1). Το RISC έχει τη δυνατότητα να ανακυκλωθεί και να αποικοδομήσει πολλά mRNA-στόχους. Συνεπώς, από μια αλληλουχία που έχει εισαχθεί σε ένα κύτταρο σε περιορισμένη ποσότητα, καθίσταται δυνατή η σίγηση ενός σχετικά μεγάλου αριθμού μορίων mRNA.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μηχανισμοί του RNAi έχουν εμπλακεί στην επigenετική αλλοίωση ομόλογων αλληλου-



Εικόνα 1. Ο μηχανισμός της παρεμβολής του RNA. Τα δίκλινα μόρια του RNA (dsRNAs) μετατρέπονται από το ένζυμο DICER σε μικρά, παρεμβτικά RNAs (si-RNAs) 21-23 νουκλεοτιδίων σε μήκος με δύο νουκλεοτίδια να υπερεκτείνονται σε κάθε άκρο. Το ξεδίπλωμα του RNA από μια ελικόση οδηγεί στην ένωση του ενός κλώνου του RNA (του antisense) με το ανενεργό σύμπλοκο RISC. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται το RISC και κόβει το mRNA που φέρει την ομόλογη αλληλουχία.

χιών DNA και σε ακραίες περιπτώσεις στον κατακερματισμό του DNA. Ο κατακερματισμός του DNA ίσως να αποτελεί τμήμα της ενορχηστρωμένης άμυνας ενός κυττάρου απέναντι στα γονίδια των παρασίτων.

## Τεχνικά θέματα στη χρήση του RNAi

Για να τεθεί σε εφαρμογή η σίγηση ενός γονιδίου με τη χρήση του RNAi απαιτείται πολύ προσεκτικός σχεδια-

σμός, καθώς και η επιλογή της κατάλληλης στρατηγικής. Δύο στρατηγικές χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως. Η πρώτη αφορά στον σχεδιασμό και την κατασκευή συνθετικών δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων RNA και την εισαγωγή τους στα κύτταρα με τη μέθοδο της επιμόλυνσης. Η τεχνική αυτή είναι η πιο διαδεδομένη για κύτταρα σε καλλιέργεια. Πρόσφατες εργαστηριακές μελέτες δείχνουν ότι η πιθανότητα επιτυχίας επλεκτικής σίγησης



μπορεί να ανιχνευθεί αν «στοχεύσουν» τα siRNAs σε συγκεκριμένες περιοχές του mRNA. Η δεύτερη στρατηγική αφορά στην εισαγωγή στο εκάστοτε κύτταρο οχημάτων μεταφοράς ή γονιδιωμάτων από ιούς που εκκράζουν siRNA με συμπληρωματικότητα στην αλληλουχία που επιθυμούμε να οδηγήσουμε σε μεταγραφική σήση.

Η επιλογή της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από την εφαρμογή της. Η επιμόλυνση με συνθετικά siRNAs εξασφαλίζει μόνο προσωρινή σήση του γονιδίου-στόχου. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να μελετήσουμε μια σειρά από βιολογικές παραμέτρους του κυττάρου σε σχέση με το ποσοστό υποέκφρασης του γονιδίου-στόχου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σήμερα σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Αντιθέτως, η σταθερή ενδογενής έκφραση των siRNAs από ενσωματωμένα ή επισωματικά αναπαραγωγικά οχήματα μεταφοράς μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνια σήση της γονιδιακής έκφρασης, γεγονός πολύ σημαντικό για τη χρήση της σε θεραπευτικές εφαρμογές, όπως η αντιμετώπιση χρόνιων ιικών λοιμώξεων.

### Εφαρμογές του RNAi στη μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων

Η χρήση της τεχνολογίας του RNAi χρησιμοποιείται τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* μελέτες με απώτερο σκοπό την κατανόηση της λειτουργίας μιας συγκεκριμένης (ή περισσότερων) πρωτεΐνων. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί πως τα κύτταρα μπορούν να επιμολυνθούν με διαφορετικούς συνδυασμούς πολλών siRNAs. Το καθένα από αυτά είναι δυνατόν να έχει διαφορετικό mRNA-στόχο και με τον τρόπο αυτό διερευνάται η σύσταση ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου. Επίσης, το γεγονός ότι απαιτείται 100% ταυτότητα μεταξύ της αλληλουχίας του RNA-στόχου και του siRNA για την πυροδότηση του μηχανισμού της μεταγραφικής σήσης, μας επιτρέπει να σχεδιάσουμε πειράματα στα οποία μπορούμε να επιτύχουμε διαφορική σήση αλληλόμορφων γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό λοιπόν, μπορούμε να παράδειγμα να σιγήσουμε επιλεκτικά το πρωτοογκογονίδιο (φυσιολογικό αλληλόμορφο) ή το μεταλλαγμένο ογκογονίδιο σε καρκινικά δείγματα.

Επιπροσθέτως, με τη χρήση του RNAi καθίσταται δυνατή η διερεύνηση του ρόλου των πρωτεϊνών σε πολυσύνθετα κυτταρικά φαινόμενα όπως είναι τα εξής:

**1. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος.** Οι πρωτεΐνες-αγγελιοφόροι των σήματων στο κύτταρο παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία όλων των οργανισμών. Στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό κάθε κυττάρου των θηλαστικών υπάρχουν υποδοχείς για τη μεταγωγή μηνυμάτων από τους αυξητικούς παράγοντες, τις κυτοκίνες, τα στεροειδή, τους νευροδιαβιβαστές οι οποίοι επάγουν την ανταπόκριση στο σήμα μέσω ενός ενδοκυττάρου καταρράκτη αντιδράσεων. Τα συστήματα μεταγωγής σήματος μέσα στο κύτταρο είναι συνήθως περίπλοκα και είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν πρωτεάσες, φωσφορυλάσες, κινάσες, και διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Μέσω της τεχνολογίας του RNAi μπορούμε να καθορίσουμε τον ρόλο της κάθε πρωτεΐνης ξεχωριστά στην οδό της μεταγωγής του σήματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της εφαρμογής του RNAi αποτελεί η μελέτη των κινάσων. Τα μικρά μόρια-αναστολείς που χρησιμοποιούνται έως τώρα, δεν είναι τόσο ειδικά και επηρεάζουν πολλές κινάσες ταυτόχρονα. Με τη χρήση του RNAi ο ρόλος της κάθε κινάσης στην οδό της μεταγωγής ενός σήματος μπορεί να διερευνηθεί. Χρησι-

μοποιώντας την τεχνολογία αυτή, οι Gzardema και συν. μείωσαν την έκφραση της υπομονάδας 110β της PI-3-κινάσης, μειώνοντας έτσι σε σημαντικό βαθμό την ανάπτυξη και την ικανότητα διήθησης των καρκινικών κυττάρων<sup>5</sup>. Οι Kiselow και συν. χρησιμοποίησαν ένα σύνολο siRNAs μέσω των οποίων κατόρθωσαν να εντοπίσουν τη συγκεκριμένη ισομορφή της πρωτεΐνης ShcA που παίζει ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης<sup>6</sup>.

**2. Πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο:** Τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο κατέχουν εξέχουσα θέση στις μελέτες με RNAi, όχι μόνο εξαιτίας της θεμελιώδους σημασίας τους στην ανάπτυξη, την ομοιοποίηση των ιστών και τη βιολογία των αρχέγονων κυττάρων, αλλά και λόγω του κεντρικού τους ρόλου στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Με τη χρήση της μεθόδου αυτής έχει διερευνηθεί ο ρόλος αρκετών γονιδίων, όπως η παράδειγμα αυτού που κωδικοποιεί την κινάση Mps1. Οι Stucke και συν. απέδειξαν πως η δράση της συγκεκριμένης κινάσης είναι αναγκαία για τον έλεγχο του σχηματισμού της αράκτου, ενώ αποδείχτηκε πως δεν παίζει ρόλο στον διπλασιασμό του κεντροσωματίου<sup>7</sup>.

**3. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κυτταρικό θάνατο-απόπτωση:** Σε πολλούς ιστούς του σώματος τα κύτταρα έχουν συγκεκριμένο χρόνο ζωής μετά από τον οποίο οδηγούνται σε απόπτωση. Η απόπτωση αποτελεί μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που καθορίζεται από συγκεκριμένο γενετικό πρόγραμμα με βάση το οποίο το κύτταρο πεθαίνει με ελεγχόμενο τρόπο και απομακρύνεται από τον ιστό χωρίς να επηρεάζονται τα γειτονικά υγιή κύτταρα. Ο μη φυσιολογικός κυτταρικός θάνατος αποτελεί κύριο πρόβλημα σε αρκετές νόσους περιλαμβανομένων και των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως οι νόσοι Alzheimer και Parkinson<sup>8,9</sup>. Είναι επίσης γνωστό πως σε πολλούς τύπους καρκίνου τα κύτταρα έχουν χάσει την ικανότητα να οδηγούνται σε απόπτωση. Η μέθοδος του RNAi έχει χρησιμοποιηθεί τον τελευταίο καιρό για τη διερεύνηση του ρόλου ορισμένων γνωστών αποπτωτικών γονιδίων όπως το p53<sup>9</sup>. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της νέας ώθησης που έφερε η χρήση του RNAi αποτελεί η διαπίστωση πως ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB στην πραγματικότητα δρα επάγοντας τη μεταγραφική αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών και όχι συμμετέχοντας άμεσα στην απόπτωση όπως ήταν μέχρι πρόσφατα γνωστό<sup>9</sup>.

**4. Πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην κυτταρική ανάπτυξη και κινητικότητα:** Με τη χρήση των μεθόδων του RNAi έχει διευκρινιστεί ο ρόλος πολλών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική κινητικότητα, καθώς και τον σχηματισμό κυτταρικών προεκτάσεων, όπως για παράδειγμα οι δενδρίτες στους νευρώνες. Μολονότι υπάρχουν ήδη ορισμένοι φαρμακολογικοί παράγοντες οι οποίοι έχουν συμβάλει στη μελέτη της κυτταρικής κινητικότητας, η κατανόηση της ρύθμισής της σε μοριακό επίπεδο παρουσιάζει αρκετά προβλήματα. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας του RNAi τα προβλήματα αυτά ήδη αρχίζουν να επιλύονται καθώς ο ρόλος συγκεκριμένων πρωτεϊνών καθορίζεται με μεγαλύτερη ακρίβεια. Για παράδειγμα, η μεταγραφική σήση του γονιδίου της πρωτεΐνης MIG-15, προκαλεί δυσλειτουργία της κατευθυνσης σύμφυτων νευράξων στον οργανισμό του *C. elegans*<sup>10</sup>.

**5. Εισβολή των ιών στα κύτταρα:** Οι ενδογενείς μηχανισμοί του RNAi είναι πιθανόν πως εξελίχθηκαν για την προστασία των κυττάρων από λοιμώδη παθογόνα, όπως είναι οι ιοί. Τα μολυσμένα κύτταρα εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό και επομένως τη διασπορά του ιού ύστερα

### Πίνακας. Πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι του RNAi

1. Καρκίνος
2. Καρδιαγγειακές νόσοι
3. Νευροεκφυλιστικές νόσοι
4. Λοιμώδεις νόσοι
5. Αυτοάνοσες νόσοι
6. Διαβήτης
  - Πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου (1,3)
  - Αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (1)
  - Αποπτωτικές πρωτεΐνες (2,3,4,5)
  - Προοδόμενα/υποδοχείς/μεταγωγή σήματος (1,2,3,4,5,6)
  - Πρωτεΐνες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (1,2,3,5)
  - Φλεγμονή (2,3,5)
  - Γονίδια ειδικά για παθογόνα (4)
  - Μεταλλαγμένα γονίδια που δρουν με επικρατή τρόπο (1,2,3,5)

**Παράδειγματα θεραπευτικών στόχων του RNAi στην ιατρική.** Η δυνατότητα που μας προσφέρει η τεχνολογία του RNAi να στοχεύουμε συγκεκριμένα γονίδια, υποδηλώνει πως είναι πιθανόν να μπορούσαμε να σταματήσουμε ή έστω να επιβραδύνουμε την εξέλιξη της νόσου. Η σήση πρωτεϊνών με σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο, όπως οι κινάσες, οι κινάσες που εξαρτώνται από τις κινάσες και η τελομεράση είναι πιθανόν να είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση του καρκίνου και ορισμένων νευροεκφυλιστικών νόσων. Η παρεμπόδιση της παραγωγής αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (π.χ. Bcl-2), αντιοξειδωτικών ενζύμων και αναστολέων της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσουν σε θάνατο τα καρκινικά κύτταρα. Αντιθέτως, η σήση αποπτωτικών πρωτεϊνών (π.χ. Bax, p53, κασπάσες) είναι πιθανόν να σταματήσει ή να επιβραδύνει τις εκφυλιστικές διαδικασίες σε αυτοάνοσες και εκφυλιστικές νόσους. Στόχος σε αυτή την περίπτωση μπορούν ακόμη να αποτελέσουν τα προοδόμενα, οι υποδοχείς και οι πρωτεΐνες-αγγελιοφόροι μεταγωγής σήματος. Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή (TNF, συνθετάση του νιτρικού οξέιδου) μπορούν να αποτελέσουν στόχο στις περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων και ασθενειών που σχετίζονται με τη φλεγμονή. Τα γονίδια ιών και βακτηρίων αποτελούν προφανή στόχο της θεραπευτικής αγωγής μέσω του RNAi στις λοιμώδεις νόσους με τις οποίες σχετίζονται.

από την παραγωγή siRNAs εναντίον γονιδίων που είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του ιού. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του RNAi έχει βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιού και κυττάρου σε μοριακό επίπεδο καθώς και του ρόλου συγκεκριμένων πρωτεϊνών στη διαδικασία αυτή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Surabi και Gaynor οι οποίοι χρησιμοποίησαν τις δυνατότητες της τεχνολογίας των siRNAs για να καταδείξουν τη σημασία της υπομονάδας p65 της πρωτεΐνης NF-κB των κυττάρων και της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού HIV-1 στη ρύθμιση των γονιδίων του ιού<sup>11</sup>. Αντίστοιχες μελέτες έχουν δώσει πολύ σημαντικές πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης ιών, όπως αυτός της ηπατίτιδας C.

### Θεραπευτικές εφαρμογές του RNAi

Η πιο προφανής ιώος χρήση της τεχνολογίας του RNAi αφορά στην αντιμετώπιση των ασθενειών στις οποίες η σήση ενός ή ορισμένων γονιδίων θα μπορούσε να επιβραδύνει ή ακόμη και να σταματήσει την πρόοδο της ασθένειας στα συγκεκριμένα κύτταρα τα οποία εκδηλώνουν την ανωμαλία που συνδέεται με την ασθένεια. Το



γεγονός ότι κάθε γονίδιο μπορεί να αποτελέσει στόχο σύλληψης μέσω του RNAi έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές να θεωρούν το RNAi ως τη μεγαλύτερη επανάσταση στη θεραπευτική μετά την ανάπτυξη των ειδικών αντισωμάτων. Οι στρατηγικές της θεραπείας μέσω του RNAi βασίζονται στη σύλληψη είτε μη βασικών φυσιολογικών γονιδίων, που σχετίζονται με την ασθένεια, είτε μεταλλαγμένων γονιδίων η μετάλλαξη των οποίων προκαλεί τη νόσο.

Οι στόχοι της θεραπευτικής χρήσης της τεχνολογίας του RNAi περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα προτεινόμενων οποίες σχετίζονται με ένα ανάλογο φάσμα νόσων και διαταραχών (Πίνακας). Αυτές οι διαταραχές περιλαμβάνουν μεταξύ πολλών άλλων τον καρκίνο, τις βακτηριακές λοιμώξεις και τις ασθένειες που οφείλονται σε ιούς.

**1. Καρκίνος:** Ο καρκίνος αποτελεί μια πολυσταδιακή διαδικασία η οποία χαρακτηρίζεται από έξι βασικές μεταβολές της κυτταρικής φυσιολογίας: (i) κυτταρική αυτάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες, (ii) έλλειψη ανταπόκρισης σε αντιανζητικά σήματα, (iii) αποφυγή της απόπτωσης, (iv) απεριόριστη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, (v) ικανότητα αγγειογένεσης, και (vi) ικανότητα διήθησης και μεταστάσης στους ιστούς.

Ο στόχος λοιπόν της θεραπευτικής χρήσης του RNAi είναι να αναστείλει τη μεταγραφή ενός ή πολλών γονιδίων ταυτόχρονα τα οποία σχετίζονται με τα φαινόμενα αυτά. Μια σημαντική παράμετρος που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι αυτή της επιλεκτικής στόχευσης του siRNA στα καρκινικά κύτταρα. Για την επιλεκτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων χωρίς να υποστούν βλάβη τα φυσιολογικά κύτταρα, θα πρέπει το RNAi να στοχεύει σε γονίδιο το οποίο εμπλέκεται αποκλειστικά στην ανάπτυξη ή την επιβίωση του καρκινικού κυττάρου (π.χ. το γονίδιο *her-2/neu* στον καρκίνο του μαστού). Για τον λόγο αυτό λοιπόν, τα πρώτα γονιδια-στόχοι ήταν γονίδια με χαρακτηριστικές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες μορφές καρκίνου, όπως η χρωμοσωμική μετατόπιση *her-abl* στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία ή οι σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *ras* που ελέγχει τον καταρράκτη της μεταγωγής μηνυμάτων τα οποία οδηγούν σε ενισχυμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετασχηματισμό των κυττάρων.

Ωστόσο, στον καρκίνο υπάρχουν πολλά γονίδια τα οποία δεν μεταλλάσσονται αλλά υπερεκφράζονται και καθιστούν τα κύτταρα ανθεκτικά στους διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς<sup>12,13</sup>. Πολλά από τα γονίδια αυτά υπερεκφράζονται σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών τύπων καρκίνου και αποτελούν ελκυστικούς στόχους για μεταγραφική σύλληψη. Αυτά περιλαμβάνουν το *mdr*, το γονίδιο της τελομεράσης, το *bcl-2*, καθώς και τα γονίδια αρκετών αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους. Μια διαφορετική προσέγγιση θα ήταν η στόχευση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση καθώς είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα χρειάζονται μεγάλες ποσότητες αίματος και αυτό το επιτυγχάνουν με την προ-

αγωγή της διαδικασίας της αγγειογένεσης. Παράλληλα με τα γνωστά γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο, νέα γονιδια-στόχοι μπορούν να προκύψουν με τη χρήση της τεχνολογίας του RNAi στον οργανισμό *C. elegans*. Η χρήση του οργανισμού αυτού ως προτύπου οφείλεται στην ομολογία που παρουσιάζει το 60% των γονιδίων του με αυτά του ανθρώπου. Μέχρι τώρα, αρκετοί ερευνητές έχουν στραφεί προς τον οργανισμό αυτό στην αναζήτηση νέων σημαντικών γονιδίων-στόχων για τον καρκίνο.

Το πρόβλημα της στόχευσης των καρκινικών κυττάρων *in vivo* αποτελεί τη μεγαλύτερη τροχοπέδη στην εφαρμογή της τεχνολογίας του RNAi σε θεραπευτικό επίπεδο. Είναι πάρα πολύ δύσκολο να διακρίνει κάποιος τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά καθώς η καρκινική εξαλλαγή δημιουργεί έναν φαινότυπο που ελάχιστα διαφέρει από τον φυσιολογικό.

**2. Λοιμώξεις νόσοι:** Πολλές νόσοι που προέρχονται από ιούς ή βακτήρια συνεχίζουν να αποτελούν κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Παράλληλα, η συνεχής εμφάνιση νέων, ανθεκτικών στελεχών και η πιθανή χρήση λοιμωδών παθογόνων από τρομοκράτες προβληματίζουν τους ειδικούς. Ο ιός HIV, ο ιός της ηπατίτιδας και της γρίπης, καθώς και ορισμένες βακτηριακές λοιμώξεις που μπορούν να προκαλέσουν θάνατο, όπως η πνευμονία, αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα. Η ικανότητα της μεθόδου του RNAi να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό ή την είσοδο στο κύτταρο ιών και άλλων παθογόνων, έχει ήδη αποδειχτεί σε *in vitro* πειράματα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά και για τον λόγο αυτό η τεχνολογία του RNAi υπόσχεται πολλά στον τομέα της θεραπείας. Οι μελέτες αυτές περιλαμβάνουν τον περιορισμό της ικανότητας του ιού HIV να προσβάλλει τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί προηγουμένως με siRNAs εναντίον της αντίστροφης μεταγραφάσης του<sup>11</sup>, καθώς και την προστασία του ήπατος των ποντικών με τη χρήση siRNAs εναντίον του αποπτωτικού υποδοχέα Fas<sup>14</sup>.

**3. Νευροεκφυλιστικές διαταραχές:** Οι νόσοι Alzheimer, Parkinson και Huntington αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα σχετικά κοινών νευροεκφυλιστικών διαταραχών που σχετίζονται με την ηλικία. Κάθε μία από τις διαταραχές αυτές χαρακτηρίζεται από τη δυσλειτουργία και τον θάνατο συγκεκριμένου πληθυσμού νευρώνων. Στις νόσους Alzheimer και Parkinson, ένα μικρό ποσοστό των περιπτώσεων οφείλεται σε συγκεκριμένες γενετικές μεταλλάξεις, ενώ η νόσος Huntington οφείλεται αποκλειστικά σε μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη χαντικτίνη (*huntingtin*)<sup>15</sup>. Μελέτες των νόσων αυτών σε ανθρώπους, καθώς και σε ζωικά μοντέλα έχουν αποκαλύψει κοινές βιοχημικές οδούς οι οποίες προκαλούν τον θάνατο των νευρώνων. Αυτοί περιλαμβάνουν το αυξημένο οξειδωτικό στρες, τη δυσλειτουργία της κυτταρικής ομοιόστασης του ασβεστίου και την απόπτωση. Εξαίτια λοιπόν των προσαναφερθέντων, οι περισσότερες προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί είτε στα

αρχικά γεγονότα που προκαλούν τη νευροεκφυλιστική διαδικασία ή στα καταληκτικά γεγονότα στον νευροδιαβαστικό καταρράκτη μεταγωγής μηνυμάτων.

**4. Καρδιαγγειακές νόσοι:** Οι καρδιαγγειακές νόσοι αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου στις ΗΠΑ και μια από τις κυριότερες στην Ευρώπη. Συνήθως, προκύπτουν από τη σταδιακή έμφραξη των αρτηριών μέσω μιας διεργασίας που ονομάζεται αρτηριοσκλήρυνση και η οποία προκαλεί τελικά την καρδιακή προσβολή. Η αρτηριοσκλήρυνση περιλαμβάνει γεγονότα, όπως είναι η τοπική παραγωγή κυτοκινών που σχετίζονται με τη φλεγμονή, προσέλκυση μακροφάγων κυττάρων και τέλος απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων του αγγειακού συστήματος. Είναι πιθανόν, λοιπόν, να μπορέσουμε να παρέμβουμε στη διαδικασία της αρτηριοσκλήρυνσης μειώνοντας τη βλάβη του καρδιακού ιστού. Τέτοια παρέμβαση μπορεί να επιτευχθεί ή με siRNA που καταστέλλουν την υπερέκφραση κυτοκινών που σχετίζονται με τις φλεγμονές ή ενζύμων των οποίων η παρατεταμένη λειτουργία συμβάλλει στα αρτηριοσκληρωτικά φαινόμενα.

## Μελλοντικές εφαρμογές του RNAi στη Βιολογία και την Ιατρική

Αν και βρισκόμαστε σε πρώιμο στάδιο όσον αφορά στην κατανόηση των μηχανισμών της τεχνολογίας του RNAi και της ανάπτυξης των μεθόδων με τις οποίες θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η σύλληψη των γονιδίων, είναι πλέον φανερό πως στο μέλλον το RNAi θα αποτελέσει ένα πειραματικό εργαλείο ευρείας χρήσης για τον καθορισμό της λειτουργίας των γονιδίων. Η αποδεδειγμένη πλέον ικανότητα των siRNAs να οδηγούν σε μεταγραφική σύλληψη του στόχου τους, καθώς και η ανάπτυξη συγκεκριμένων μεθόδων εισαγωγής τους στο κύτταρο έχουν οδηγήσει σε μια «έκρηξη» δημοσιεύσεων με τη χρήση της παρεμβολής του RNA. Παράλληλα, η δημιουργία έτοιμων σκευασμάτων RNAi από τις εταιρίες έχει διευκολύνει ακόμη περισσότερο τη δουλειά των ερευνητών.

Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη αρκετά προβλήματα που θα πρέπει να αντιμετωπιστούν, με πρώτο και κυριότερο την εφαρμογή των μεθόδων του RNAi σε *in vivo* μελέτες. Η πολύ αργή, σε σχέση με το αναμενόμενο, πρόοδος που παρατηρείται στην εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας έχει αναγάγει τη μέθοδο του RNAi σε ιδιαίτερα σημαντική ελπίδα για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών. Είναι βέβαια δύσκολο στην παρούσα φάση να οριστεί με σαφήνεια το ακριβές φάσμα των επιδράσεων των siRNA σε γονιδια-στόχους. Το ακριβές ποσοστό σύλληψης γονιδια-στόχων αποτελεί ένα ακόμη αντικείμενο έρευνας. Πιθανότατα η *παρεμβολή RNA* θα χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους οι οποίες θα βοηθήσουν στον εντοπισμό των siRNA στους κατάλληλους ιστούς και στην αξιοποίηση του αποτελέσματος σύλληψης για τη μεταβολή της κυτταρικής φυσιολογίας προς την επιθυμητή κατεύθυνση. ♦

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fire A et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-11.
2. Elbashir SM et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-8.
3. Cazulera F et al. Functional studies of the PI(3)-kinase signalling pathway employing synthetic and expressed siRNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 670-82.
4. Kisielou M et al. Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA. *Biochem J* 2002; 363: 1-5.
5. Stucke VM et al. Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J* 2002; 21: 1723-32.
6. Miller VM et al. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference:

- an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 661-8.
7. Alber L et al. Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 2004; 131: 3229-36.
8. Voorhoeve PM, Agami R. Unravelling human tumor suppressor pathways: a tale of the INK4A locus. *Cell Cycle* 2004; 3: 616-20.
9. Mattson MP, Camandola S. NF- $\kappa$ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* 2001; 107: 247-54.
10. Pomati P et al. A conserved interaction between beta1 integrin/PAT-3 and Nck-interacting kinase/MIG-15 that mediates commissural axon navigation in *C. elegans*. *Curr Biol* 2002; 12: 622-31.
11. Jaquez et al. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; 418: 435-8.

12. Zounpoudis V et al. High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene* 2000; 19: 4011-4021.
13. Papassava P et al. Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 8573-84.
14. Song et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003; 9: 347-51.
15. Xia et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 2004; 10: 816-20.